

10/533300

Rec'd PCT/PTG 29 APR 2005

PCTEP 03/11799

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

#2

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

REC'D 20 JAN 2004	
WIPO	PCT

Aktenzeichen:

102 51 205.1

Anmeldetag:

31. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber:

IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Gewinnung und Anwendung eines
neuen osteoanabolen Faktors aus Hämofiltrat,
HF-Chondroosteomodulin, für die Behandlung von
Knochen- und Knorpelerkrankungen mit spezieller
Berücksichtigung der Osteoporose und Arthrose

IPC:

C 07 K 14/435

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

BEST AVAILABLE COPY

Offenlegungsschrift

Bundesrepublik Deutschland

Deutsches Patentamt DE

Aktenzeichen

Anmeldetag

Offenlegungstag

Anmelder:

IPF PharmaCeuticals GmbH
z.Hd. Prof. Dr.med. Wolf-Georg Forssmann
Feodor-Lynen-Str. 31
D – 30 625 Hannover DE

Erfinder:

Dr. Wolfgang Meder
D – 30 625 Hannover DE

Dr. Martin Wendland
D – 30 625 Hannover DE

Dr. Harald John
D – 30 625 Hannover DE

Dr. Rudolf Richter
D – 30 625 Hannover DE

Prof. Dr.med. Markus Meyer
D – 30 625 Hannover DE

Prof. Dr.med. Wolf-Georg Forssmann
D – 30 625 Hannover DE

Patentantrag

Verfahren zur Gewinnung und Anwendung eines neuen osteoanabolen Faktors aus Hämofiltrat, HF-Chondroosteomodulin, für die Behandlung von Knochen- und Knorpelerkrankungen mit spezieller Berücksichtigung der Osteoporose und Arthrose.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines neuen Stoffes in reiner oder partiell aufgereinigter Form aus Körperflüssigkeiten und Geweben, die die Fähigkeit besitzen, Knochenzellen (Osteoblasten und Osteoklasten) und Knorpelzellen in ihrer Funktion zu beeinflussen. Diese Stoffe sind dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der Körperflüssigkeit menschliches Blutfiltrat (HF) gewonnen werden können. Der Stoff ist als HF-Chondroosteomodulin bezeichnet und kann zum Zwecke der medizinischen und gewerblichen Verwendung als Medikament zur Behandlung von Knochen- und Knorpelerkrankungen benutzt werden.

Zur Analyse von Stoffen aus Peptidbibliotheken wurde ein Bioassay entwickelt, der an transfizierten CHO-Zellen eine Aktivierung der Signaltransduktion zeigt. Überraschenderweise wurden im Blutfiltrat aktivierende Substanzen gefunden, die in Zellkulturen von GORI-28-Rezeptoren transfizierter Zellen in der intrazellulären Ca^{++} -Aktivierung beeinflussen. Dieser Rezeptor ist funktionell auf osteogenen Zellen aktiv. Die Beeinflussung wurde u.a. gemessen aufgrund der Stimulierung von intrazellulärer Ca^{++} -Aktivierung von Zellen, die auf der Membranoberfläche den GORI-28-Rezeptor tragen. Mit Hilfe dieses Testes konnte aus Peptidbibliotheken, die uns zur Verfügung stehen, überraschenderweise eine Substanz identifiziert werden, die in der HF-Peptidbibliothek (menschliches Blutfiltrat) charakteristische Elutionsprofile in den Chromatographieaufreinigungen zeigt. Die Substanz wurde isoliert und durch massenspektrometrische, einschlägige Analysen als molekulare Einheit identifiziert. Es handelt sich um eine zirkulierende Form des bereits aus Klonierung gefundenen TIG2 (Tazarotene-induced responder protein 2; Nagpal S. et al. (1997) J. Invest. Dermatol., 109: 91-95). Die vorliegende Erfindung betrifft somit einen neuen osteochondroaktiven Faktor, das HF-Chondroosteomodulin, mit den folgenden molekularen Eigenschaften:

- (1) Molekulargewicht des Precursors (aus Gendaten): 18617 Da
- (2) Molekulargewicht des gefundenen Proteins: 15571 Da
- (3) Chromatographisches Verhalten: siehe Beispiele

Beispiele

Beispiel 1

Die Isolierung von HF-Chondroosteomodulin aus 10.000 Liter menschlichem Blutfiltrat wurde nach folgendem Beispiel vorgenommen:

Isolierung von Hämostin aus Hämofiltrat: Reinigungsstrategie

Kollektion von 10.000 L-Batch menschlichen Hämofiltrats

Kationen-Austauscher-Chromatographie (Eluat)	1. Schritt
RP-Amberlite-Chromatographie (Stufenelution)	2. Schritt
Bakerbon RP C18-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	3. Schritt
RP-Biotek C4-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	4. Schritt
RP-Vydac C18-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	5. Schritt
RP-Phenomenex C5-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	6. Schritt
Poly Hydroxyethyl HILIC-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	7. Schritt
RP-Reprosil C18-Säulenchromatographie (Gradientenelution)	8. Schritt

Hohe Reinheit erreicht

Aus 10.000 Liter Hämofiltrat wurde die Substanz zur hohen Reinheit aufgetrennt. HF-Chondroosteomodulin zeigt die chromatographischen, massenspektrometrischen und molekularen Eigenschaften wie in Beispiel 2 gezeigt.

Beispiel 2

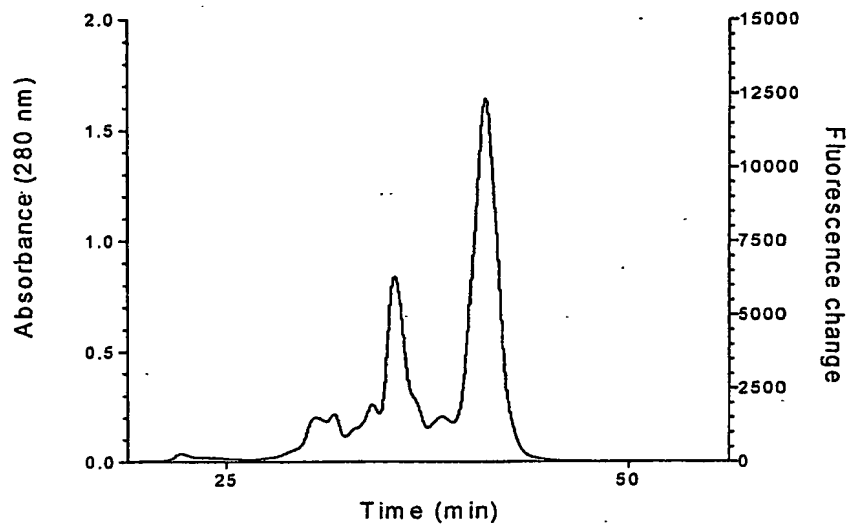


Abbildung 1

Schritt 4 der chromatographischen Reinigung von HF-Chondroosteomodulin.

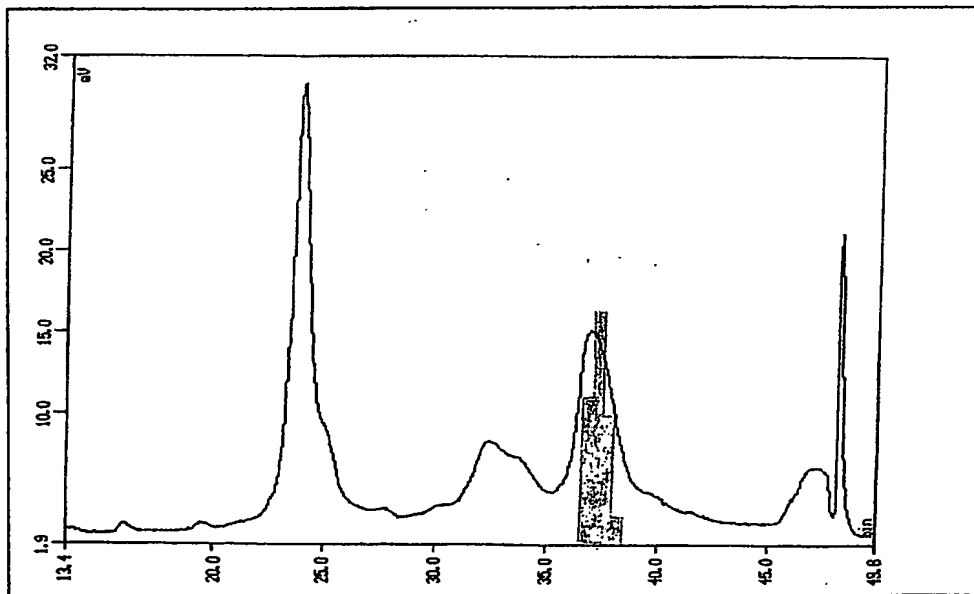


Abbildung 2

Schritt 7 der chromatographischen Reinigung von HF-Chondroosteomodulin.

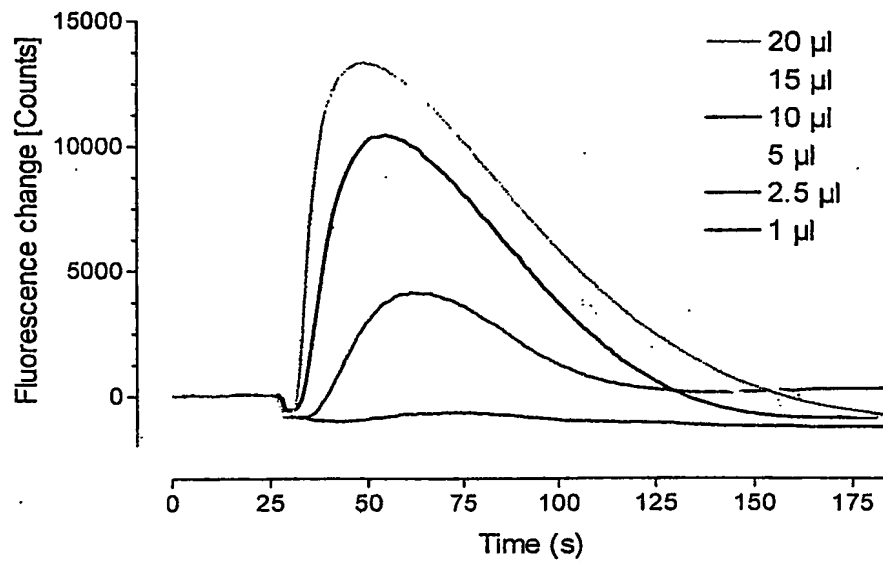


Abbildung 3

Dosis-Wirkungs-Korrelation. Aufgetragen ist die Veränderung der Fluoreszenz gegen das eingesetzte Volumen von Fraktion 30 des 8. Aufreinigungsschrittes (siehe Beispiel 1).

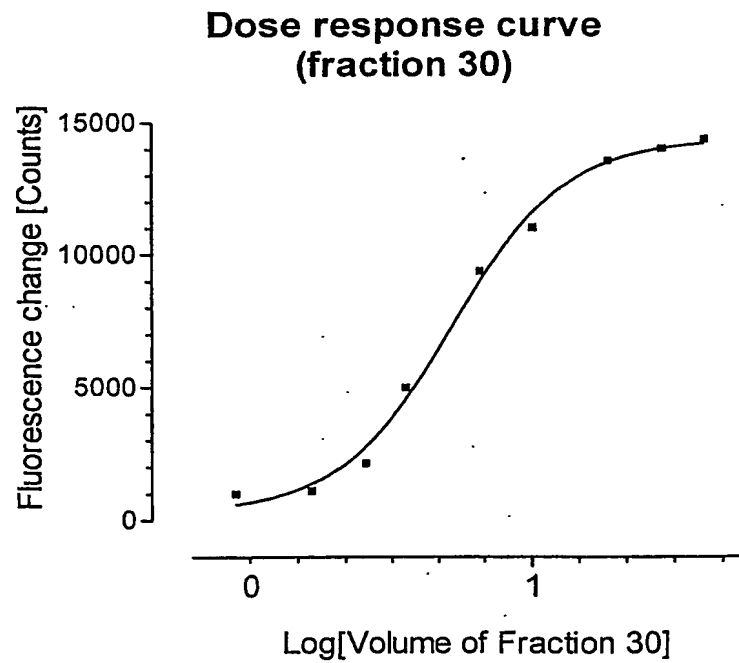


Abbildung 4

Dosis-Wirkungs-Kurve. Aufgetragen ist die Veränderung der Fluoreszenz gegen das eingesetzte Volumen von Fraktion 30 des 8. Aufreinigungsschrittes (siehe Beispiel 1).

Aminosäuren-Sequenz des prozessierten Proteins aus 134 Aminosäuren mit dem Molekulargewicht 15571 Da:

ELTEAQRRLGLQVALEEFHKHPPVQWAFQETSVESAVDTPFPAGIFVRLEFKLQQTSCR
KRDWKKPECKVRPNGRKRKCLACIKLGSEDKVLGRLVHCPIETQVLREAEHQETQCL
RVQRAGEDPHSFYFPGQF

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß im menschlichen Blutfiltrat eine zirkulierende Substanz vorkommt, die isoliert und charakterisiert werden konnte. Sie übt eine osteochondroanabole Wirkung aus.

Patentansprüche

1. HF-Chondroosteomodulin als Fragment von TIG2 sowie seine natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate, insbesondere amidierter, acetylierter, phosphorylierter und glycosylierter Derivate.
2. HF-Chondroosteomodulin und dessen Rezeptor GORI-28 als Ligand-Rezeptor-System zum Screening von Substanzen aus Peptidlibraries oder anderer Stoffbanken und Verwendung als Drug Target.
3. Verfahren zur Herstellung von HF-Chondroosteomodulin oder seiner Derivate nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß es über Zellkulturen hergestellt und chromatographisch gereinigt wird.
4. Verfahren zur Herstellung von HF-Chondroosteomodulin oder seiner Derivate nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man es aus menschlichem Blut über übliche Chromatographie-Verfahren in bekannter Weise isoliert.
5. Verfahren zur Herstellung von HF-Chondroosteomodulin oder seiner Derivate nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß man Hämostin und Gastrostin durch die üblichen Verfahren der chemischen oder biotechnologischen Synthese herstellt und es mit den gängigen Chromatographie-Verfahren reinigt.
6. Arzneimittel enthaltend das humane, zirkulierende Peptid nach Anspruch 1, das HF-Chondroosteomodulin als aktiven Wirkstoff neben üblichen Hilfs- und Zusatzstoffen.
7. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen der Nebenschilddrüse, insbesondere bei deren Unterfunktion (Hypoparathyreodismus).

8. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von degenerativen Knochenerkrankungen, insbesondere der Osteoporose.
9. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Knochenfrakturen in der Heilungsphase, zur Behandlung von Knorpelerkrankungen, Bindegewebserkrankungen, Rheuma und Arthrose.
10. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems.
11. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die mit der Migrationsbeeinflussung von Stammzellen therapiert werden, u.a. die Chemotherapie.
12. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Nierenerkrankungen, die mit Störungen der Elektrolytausscheidung einhergehen, insbesondere bei der akuten Niereninsuffizienz sowie Phosphat- und Calciumausscheidungsstörungen.
13. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose von Erkrankungen, insbesondere nach irgendeinem der Ansprüche 6 – 13, in dem spezifische Antikörper gegen das synthetische Molekül hergestellt werden und die Blutkonzentration von HF-Chondroosteomodulin über Immuntests oder über quantitative Massenspektrometrie gemessen wird.

14. Verwendung von HF-Chondroosteomodulin sowie seiner natürlichen und pharmakologisch verträglichen Derivate nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels in verschiedenen galenischen Applikationsformen, insbesondere als Lyophilisat.
15. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die galenische Applikationsform, insbesondere die lyophilisierte, mit Mannit aufgenommene Form in sterilen Ampullen zur Auflösung in physiologischer Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen zur wiederholten Einzelinjektion und/oder Dauerinfusion in Mengen von 300 Mikrogramm bis 30 Milligramm reines HF-Chondroosteomodulin pro Therapie-Einheit enthält.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine neue Substanz aus dem Organismus vom Menschen sowie deren natürliche Funktion, eine Wirkung auf Knochenzellen wie Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten darstellt. Die mit ihren chemischen Analoga und biologischen Derivaten vergleichbaren Substanzen werden zum Zwecke der therapeutischen, diagnostischen und gewerblichen Verwendung als Arzneimittel benutzt, nachdem sie in ihrer Struktur aufgeklärt wurden. Die Substanzen können mittels chemischer oder rekombinanter Synthese sowie aus Vorläufermolekülen durch chemische Prozesse verfahrensmäßig hergestellt werden und in hochreiner Form galenisch aufbereitet zur Verwendung als Arzneimittel bereitgestellt werden.